

SCHNELLBESTIMMUNGEN DER BLUTGLUCOSE
MIT EINEM
VERBESSERTEN REFLEKTOMETERSYSTEM

Aldo Fach
—

1976
—

Aus der Forschergruppe Diabetes
und der III. Medizinischen Abteilung
des Krankenhauses München-Schwabing
Chefarzt Professor Dr. Hellmut Mehnert

SCHNELLBESTIMMUNGEN DER BLUTGLUCOSE
MIT EINEM VERBESSERTEN REFLEKTOMETERSYSTEM

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der
Doktorwürde in der gesamten Medizin verfaßt
und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität
zu München vorgelegt

von Aldo Fach aus München

München 1976

Gedruckt mit Genehmigung des
Fachbereiches Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. H. Mehnert
Dekan: Professor Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 18. Mai 1976



Inhaltsverzeichnis

A) Einleitung

B) Material und Methodik

1. Versuchssubstrat

Meinen Eltern und

meiner Frau Eva-Maria

in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

2) Versuchsmethodik

1) Versuchsmethodik

Hydrogenase-Aktivität in Hydrogengas

2) Versuchsmethodik

C) Statistische Auswertung

D) Ergebnisse der Ergebnisse

E) Diskussion

1) Besprechung des vorliegenden Schrifttums

2) Diskussion der eigenen Ergebnisse

3) Fazit

F) Zusammenfassung

G) Literaturverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

A) Einleitung

B) Material und Methodik

I. Untersuchungsgut

II. Untersuchungsmethoden

1) o-Toluidin-Methode

2) Hexokinase-Glucose-6-Phosphat- Dehydrogenase-Methode im Autoanalyser

3) Dextrostix/EyetoneTM-Reflektometer

III. Statistische Auswertung

C) Besprechung der Ergebnisse

D) Diskussion

1) Besprechung des vorliegenden Schrifttums

2) Diskussion der eigenen Ergebnisse

3) Praktische Wertung

E) Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

A) Einleitung

Zur Diagnostik, Einstellung und Kontrolle des Diabetes mellitus sind neben den Urinzuckerbestimmungen die Blutglucose-Werte am aussagekräftigsten.

Die bisherigen Methoden zur Blutzuckerbestimmung sind relativ aufwendig und bringen die gewünschten Resultate erst nach einem längeren Zeitraum. Daher liegt der Gedanke nahe, eine genauere Methode der Schnelltestung mittels Teststreifen zu entwickeln. Seit 1957 kann die Blutglucose halb quantitativ mit Teststreifen auf enzymatischer Grundlage schnell, einfach und relativ genau bestimmt werden. 1964 wurde diese Methode durch Einführung der Dextrostixstreifen insoweit verbessert, als man erstmals die Möglichkeit hatte, in kurzer Zeit ohne großen Aufwand einen annähernd genauen Blutzuckerwert zu erhalten (4). Dabei konnte in Notfällen wenigstens eine Hypoglykämie von einer Hyperglykämie unterschieden werden. Man gewann mit dieser Methode für die richtige Behandlung des Patienten unter Umständen wertvolle Zeit. Natürlich hat diese Schnelltestung den Nachteil mangelnder Genauigkeit, der verursacht wird durch Ablesefehler sowie möglicherweise mangelnde Sorgfalt und Erfahrung der Prüfer bei individuell verschiedenem Schätzvermögen. Außerdem war die

Bestimmung der Blutglucosekonzentration nur bis zu 250 mg/100 ml möglich. Deshalb wurde eine Verkürzung der Reaktionszeit diskutiert, um Ablesungen bis 600 mg/100 ml vornehmen zu können (10, 11). Diese Modifikation der Methode bewährte sich jedoch in der Praxis nicht, da die Streubreite hierbei um 30 % vom Sollwert lag.

Erst durch die reflektometrische Auswertung der herkömmlichen Teststreifen durch ein neuentwickeltes Gerät (1971/72) wurde eine relativ präzise Schnellbestimmung der Blutglucose bis zu Konzentrationen von 1000 mg/100 ml möglich, was für die Komadiagnostik sehr wertvoll war. Jedoch war dieses Gerät technisch noch nicht ausgereift im Hinblick auf die Eichmöglichkeiten, die Wartung und die schwierige Handhabung.

Ziel dieser Arbeit war die Prüfung eines verbesserten Reflektometers (EyetoneTM/Ames) in Hinsicht auf die klinische Brauchbarkeit. Dabei sollten die Glucosewerte der damit untersuchten Blutproben in Relation zu den herkömmlichen laborchemischen Bestimmungen gesetzt und statistisch ausgewertet werden.

B) Material und Methodik

I. Untersuchungsgut

Insgesamt wurden 969 vergleichende Blut-glucosebestimmungen an stationären und ambulanten Diabetikern mit jeweils zwei verschiedenen laborchemischen Referenzmethoden vorgenommen. In 916 Fällen diente als Referenzmethode die o-Toluidin-Methode und in 762 Fällen die Hexokinase-Methode. In der Mehrzahl der Bestimmungen wurden beide Referenzmethoden angewandt.

Als Blutprobe wurde Kapillarblut aus der Fingerbeere bzw. dem Ohr läppchen verwendet. Zuerst wurde das Blut zur Glucosebestimmung durch die jeweiligen Referenzmethoden gewonnen. Aus derselben Stichincision erfolgte auch die Blutentnahme für den Schnelltest. Diese Reihenfolge wurde aus praktischen Erwägungen eingehalten, eine versuchsweise vorgenommene Umkehr der Entnahmen brachte keine Änderung der Ergebnisse.

Für die Schnelltestung wurde, wie vorgeschrieben, nur ein großer, nicht ausgepreßter Blutstropfen, der die gesamte Reaktionsfläche des Teststäbchens bedeckte, verwendet.

Sämtliche Blutzuckerbestimmungen durch das neue Reflektometer wurden nur von einer Person durchgeführt, wobei vor Beginn der Untersuchungsreihe zur Einübung ca. 100 Probeentnahmen und -bestimmungen erfolgten, die nicht zur Auswertung gelangten.

II. Untersuchungsmethoden

1) O-Toluidin-Methode

Diese Furfurolnachweismethode ist relativ spezifisch für Zucker. Mit ihr werden jedoch in gleicher Weise neben Glucose auch die Monosaccharide wie Mannose und Galaktose erfaßt. Disaccharide wie zum Beispiel Lactose ergeben lediglich 30 % der Farbänderung einer gleichen Menge Glucose. In stark saurem Milieu bilden sich unter Wasseraustritt beim Erhitzen durch Ringschluß aus Pentosen, Hexosen und Heptosen Furfurole und Methoxyfurfurole. Dabei entstehen durch Kondensieren mit Phenolen gefärbte Verbindungen, die photometrisch gemessen werden können. Hierbei wird besonders das im Handel erhältliche o-Toluidin in konzentrierter Essigsäure zum Glucosenachweis herangezogen (3). Hydroxymethylfurfurol bildet mit o-Toluidin eine sogenannte Schiff'sche Base, dies ist ein bläulich gefärbter Komplex, dessen Extinktionsmaximum etwa bei 623 m μ liegt.

Durchführung:

Als Reagentien werden verwendet:

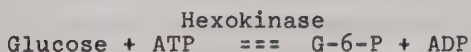
3 % Trichloressigsäure zur Enteiweißung,
o-Toluidin 6 Vol% in Eisessig als Farbreagens
und zusätzlich 0,15 % Thioharnstoff als
Stabilisator.

Es wird 0,1 ml Blut in 1 ml 3 % Trichloressigsäure enteiweißt, 5 min. bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert und davon 0,5 ml mit 3 ml

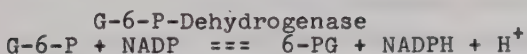
o-Toluidin-Reagens versetzt und 8 min. in kochendem Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wird am Photometer mit dem Hg-Filter 623 mμ die Extinktion abgelesen.

2) Hexokinase-Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Methode im Autoanalyser

Bei dieser Methode gibt es keine Gruppenreaktion, sondern es reagiert nur Glucose. Diese wird in Anwesenheit von ATP und Hexokinase in Glucose-6-Phosphat überführt:



Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase oxydiert Glucose-6-Phosphat in Anwesenheit von NADP zu 6-Phospho-Gluconsäure. NADP wird bei dieser Reaktion zu NADPH + H⁺ reduziert.



Da die Reaktion stöchiometrisch verläuft, ist das entstehende NADPH der oxydierten Glucose äquivalent, d.h. die Farbtintensität ist der vorhandenen Glucose direkt proportional. Das NADPH läßt sich auf Grund seiner Absorption bei 340 bzw. 366 mμ am Photometer messen.

Durchführung:

In einem Zentrifugenglas mit 1,5 ml 3,6 %iger Perchlorsäure werden zur Enteiweißung 0,1 ml Kapillarblut pipettiert. Die photometrische Auswertung erfolgt mittels Autoanalyser (3, 19).

3) Dextrostix/EyetoneTM-Reflektometer (Ames)

Bei den vorliegenden Dextrostix-Teststreifen handelt es sich um mit Glucoseoxydase, Peroxydase und H-Donator imprägnierte Teststreifen, die durch eine semipermeable Membran geschützt sind, auf die jeweils ein Tropfen Blut aufgetragen werden muß. Dabei wird Glucose durch Glucoseoxydase zu Gluconsäure oxydiert. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxyd wird durch Peroxydase in Gegenwart des Wasserstoff-Donators (Farbstoff) zu Wasser reduziert. Es tritt eine Farbentwicklung auf, deren Intensität gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz der vorhandenen Glucose direkt proportional ist. Mit einer Farbskala kann man die Blutglucosekonzentration durch Vergleich schätzen.

Die Farbintensität des Teststreifens kann nun wesentlich genauer mit dem vorliegenden EyetoneTM-Reflektometer bestimmt werden. Dieses an ein Stromnetz anzuschließende Gerät ist ein kleiner, leichter und kompakt transportabler Apparat, welcher in Verbindung mit Dextrostix-Teststäbchen den Glucosegehalt im Vollblut bestimmt. Die Meßskala des Gerätes erlaubt Abmessungen innerhalb des Bereiches von 10 bis 400 mg/100 ml Blut.

Durchführung:

Das Gerät wird an ein Stromnetz angeschlossen und eingeschaltet. Dies sollte 30 min. vor Gebrauch geschehen. Dann wird mittels der Eichstäbchen, deren Farbseite zur Meßskala

zeigen muß, das Gerät geeicht. Dabei muß das Eichstäbchen in die Meßöffnung bis zum Anschlag eingesteckt werden, die Schaltklappe in der Mitte eingedrückt und die Anzeigenadel mittels des Eichrädchens, das sich auf der rechten Außenseite des Gerätes befindet, in Position "set 1" auf der Skala (50 mg/100 ml) eingestellt werden. Der gleiche Eichvorgang ist für ein Teststäbchen "set 2" durchzuführen, wobei die Nadel exakt auf 400 mg/100 ml eingestellt werden muß. Dieser Meßvorgang mit den zwei Eichstäbchen "set 1" und "set 2" muß mindestens zweimal wiederholt werden bzw. in der ersten halben Stunde nach Einschalten des Gerätes vor jeder Blutglucosebestimmung. Auch sollte bei Reihenbestimmungen der Eichvorgang öfter wiederholt werden.

Ein großer Tropfen Kapillarblut, der aus einer durch eine sterile Lanzette gesetzten Wunde der Fingerbeere oder des Ohr läppchens gewonnen wird, wird auf die ganze Reaktionszone eines Dextrostix-Teststäbchens gebracht. Danach müssen genau 60 sec gewartet werden und daran anschließend die Blutreste mit einem scharfen Wasserstrahl aus einer Spritzflasche entfernt werden. Sodann muß die Reaktionszone des Teststäbchens mit zwei Blättern eines nicht fusselnden Filterpapieres abgetupft werden. Das Teststäbchen wird danach mit der Reaktionsseite zur Skala zeigend bis zum Anschlag in die Meßöffnung eingesteckt, die Schaltklappe in der Mitte fest angedrückt, der Nadelausschlag beobachtet und der festgestellte Wert der Blutglucosekonzentration notiert. Für diesen

Vorgang werden in der Regel nicht mehr als 10 sec nach Ablauf der 60 sec benötigt.

Im Laufe unserer Untersuchungen stellten wir fest, daß es wichtig ist, die Schaltklappe mit konstantem Druck bis zum vollständigen Ausschlag des Zeigers zu betätigen. Wiederholt fanden sich Teststreifen, die in ihrer Breite von den üblichen abwichen und somit nicht zur Bewertung durch das Reflektometer herangezogen werden konnten.

III. Statistische Auswertung

Bei diesen Untersuchungen wurden Einzelwerte ermittelt, von denen wiederum Mittelwerte errechnet wurden.

$$\text{Mittelwert } x_m = \frac{x_i}{n}$$

x_i = Summe der Einzelwerte

n = Anzahl der Werte

Ferner wurden zwei voneinander abhängige Größen beurteilt, d.h. eine Variable wird als unabhängig (x), die andere als abhängig (y) betrachtet. y ist somit eine Funktion von x . Es liegt also eine Stichprobe von Beobachtungen $(x_1, y_1, x_2, y_2, \dots, x_n, y_n)$ aus einer zweidimensionalen Gesamtheit vor und es erscheint angebracht, diese Zahlenpaare als Punkte in die xy -Ebene in der üblichen Weise einzutragen. Stellt sich dabei heraus, daß diese Punkte nahezu auf einer Geraden liegen, so läßt sich nach Errechnung

der Regressionskoeffizienten eine Regressionsgerade von y bezüglich x konstruieren. Das Gaus'sche Prinzip der kleinsten Quadrate kann dabei zur objektiven Bestimmung dieser Geraden hergenommen werden, d.h. sie ist so zu legen, daß die Summe der Quadrate aller Abstände der Meßpunkte von der Geraden möglichst klein wird. Man kommt daher zu der errechneten Regressionsgeraden durch folgende Formel:

$$y - y_m = b (x - x_m)$$

Dabei wird das Steigungsmaß der Regressionsgeraden als Regressionskoeffizient bezeichnet und folgendermaßen berechnet:

$$b = \frac{S_{xy}}{(S_1)^2}$$

S_{xy} = Kovarianz der Stichprobe

S_1 = Varianz der x -Werte

Anschließend wird das Konfidenzintervall für den Regressionskoeffizienten für eine Konfidenzzahl von 99 % errechnet.

Wird nun die Beziehung zwischen zwei Zufallsvariablen x und y betrachtet, ohne die eine als abhängig und die andere als unabhängig zu sehen, so kann die Korrelation zwischen x und y beurteilt werden. Der Korrelationskoeffizient ist das geometrische Mittel der beiden Regressionskoeffizienten. Dieser Regressionskoeffizient der jeweiligen Stichprobe wird nach der Formel

$$r = \frac{S_{xy}}{S_1 S_2}$$

errechnet, wobei S_1 die Streuung der x-Werte und S_2 die Streuung der y-Werte sind und S_{xy} die Kovarianz der Stichprobe ist.

Die Stichprobenwerte liegen auf einer Geraden, wenn der zugehörige Korrelationskoeffizient den Wert $+1$ oder -1 hat.

Auch für die jeweiligen Korrelationskoeffizienten bestimmten wir die Konfidenzintervalle (9).

C) Ergebnisse

Wie angegeben, wurden als Referenzmethoden die o-Toluidin-Methode und die Hexokinase-Methode durchgeführt.

Die Ergebnisse der Versuchsmethode (EyetoneTM) wurden gegen die Referenzmethode - o-Toluidin - in ein Koordinatensystem eingetragen. Dabei konnte eine lineare Abhängigkeit der beiden Methoden beobachtet werden. Es ließ sich eine Regressionsgerade mit dem Regressionskoeffizienten

$$b = 1,13 \pm 0,01 \ (p < 0,01)$$

ermitteln. Ferner wurde ein Korrelationskoeffizient

$$r = 0,928 \pm 0,01 \ (p < 0,01)$$

errechnet.

Mit der zweiten Referenzmethode (Glucose-UV-Test mit Hexokinase) ergab sich eine Regressionsgerade mit dem Regressionskoeffizienten

$$b = 1,001 \pm 0,03 \ (p < 0,01)$$

und ein Korrelationskoeffizient

$$r = 0,945 \pm 0,01 \ (p < 0,01)$$

Es zeigt sich, daß die jeweiligen Regressionskoeffizienten nur wenig von dem für unser System idealen Regressionskoeffizienten von 1 (Steigung der 45° Achse) abweichen.

Auch die Übereinstimmung der reflektometrisch bestimmten Werte mit denen der zwei Referenzmethoden kann bei Korrelationskoeffizienten von 0,928 und 0,945 als gut bezeichnet werden. Daß die Regressionsgeraden nicht durch den Nullpunkt gehen, läßt auf einen Systemfehler der Methodik schließen.

Bei Betrachtung der Einzelwerte liegen die mit dem EytoneTM-Gerät gemessenen Blutglucosekonzentrationen gegenüber den mit der Hexokinase-Methode ermittelten Werte im Mittel nur geringfügig tiefer.

Gegenüber den Werten, die mit der o-Toluidin-Methode ermittelt wurden, liegen die mit dem EytoneTM-Gerät gemessenen Blutzuckerkonzentrationen im Mittel etwas zu hoch, wie aus dem Regressionskoeffizienten von $b = 1,13$ ersichtlich ist.

Bei der Aufgliederung in Einzelbereiche bestätigt sich, daß die Versuchsmethode (EytoneTM) mit dem Hexokinase-Verfahren am besten korreliert. Wie oben schon festgestellt, liegen die mit dem Reflektometer gewonnenen Blutzuckerwerte im Mittel etwas niedriger als bei der Referenzmethode, was besonders für die Diagnostik von Hypoglykämien bedeutungsvoll sein kann. So entspricht beispielsweise einem mit der Hexokinase-Methode ermittelten Blut-

zuckerwert von 60 mg/100 ml im Mittel ein mit dem EyetoneTM-Gerät gemessener Wert von 49 mg/100 ml (Tab. 3).

Die gesondert aufgeführten Blutzuckerbereiche von 80 mg bis 140 mg/100 ml und von 160 mg bis 250 mg/100 ml Blut haben zwar schlechtere Korrelationskoeffizienten, bestätigen aber die für den Gesamtbereich zutreffenden statistischen Aussagen.

Für den diagnostisch wichtigen Bereich von 140 mg bis 160 mg/100 ml liegen die Korrelationskoeffizienten bei Vergleich der Versuchsmethode mit der o-Toluidin-Methode bei $r = 0,237$ und mit der Hexokinase-Methode bei $r = 0,396$. Diese statistische Aussage bedeutet in der Praxis, wie aus Abbildung 1 und 2 zu ersehen ist, daß die mit dem Reflektometer gemessenen Einzelwerte zwischen 90 mg und 225 mg/100 ml (Referenzmethode o-Toluidin) und zwischen 90 mg und 195 mg/100 ml (Referenzmethode Hexokinase) schwanken.

Einschränkend ist jedoch zu erwähnen, daß auch die Referenzmethode Hexokinase bei gleichzeitiger Analyse in zwei verschiedenen Labors (533 Proben) Schwankungen unterliegt: Labor I Blutzuckerbereich von 140 mg bis 160 mg/100 ml gegenüber Labor II 110 mg bis 176 mg/100 ml.

Bei Blutproben von Patienten mit einem schwer entgleisten Diabetes mellitus mit Blutzuckerwerten über 400 mg/100 ml wurde gegen Ende der Untersuchungsreihe die Reaktionszeit auf 30 Sekunden verkürzt. Es sollte beurteilt werden,

ob aussagekräftige Ergebnisse zu bekommen sind, wenn man den so ermittelten Wert mit dem Faktor zwei multipliziert. Dabei wurde als Referenzmethode die Hexokinase-Methode verwandt. Als große Schwierigkeit erwies sich das genaue Einhalten der sehr kurzen Reaktionszeit von 30 Sekunden. Bei der Betrachtung von 14 Blutzuckerwerten ließ sich feststellen, daß eine überschlagsmäßige Abschätzung der tatsächlichen Blutzuckerwerte über 400 mg/100 ml möglich sein könnte (Tab. 4).

- Abbildung 1: Vergleich von Dextrostix-Reflektometer-System mit der o-Toluidin-Methode.
Blutglucosewerte von 0 mg bis 400 mg/100 ml
- Abbildung 2: Vergleich von Dextrostix-Reflektometer-System mit der Hexokinase-Methode.
Blutglucosewerte von 0 mg bis 400 mg/100 ml
- Tabelle 1: Korrelations- und Regressionskoeffizienten bei Anwendung der Reflektometer-Methode im Vergleich zu den Referenzmethoden
- Tabelle 2: Korrelations- und Regressionskoeffizienten beim Vergleich der Referenzmethode Hexokinase, durchgeführt in zwei verschiedenen Labors
- Tabelle 3: Mittelwerte und Korrelationskoeffizienten von Versuchs- und Referenzmethoden in verschiedenen Blutzuckerbereichen (mg/100 ml)
- Tabelle 4: Vergleich von mit dem Faktor zwei multiplizierten 30 sec Blutglucosewerten der Reflektometer-Methode und Blutzuckerwerten der Hexokinase-Methode

Vergleich von Blutglucosewerten der Dextrostix/Reflektometer-Methode und der o-Toluidin-Methode

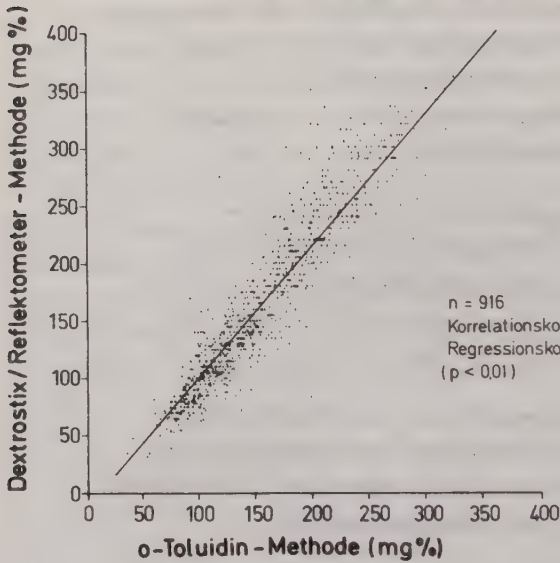


Abbildung 1

Vergleich von Blutglucosewerten der Dextrostix/Reflektometer-Methode und der Hexokinase-Methode

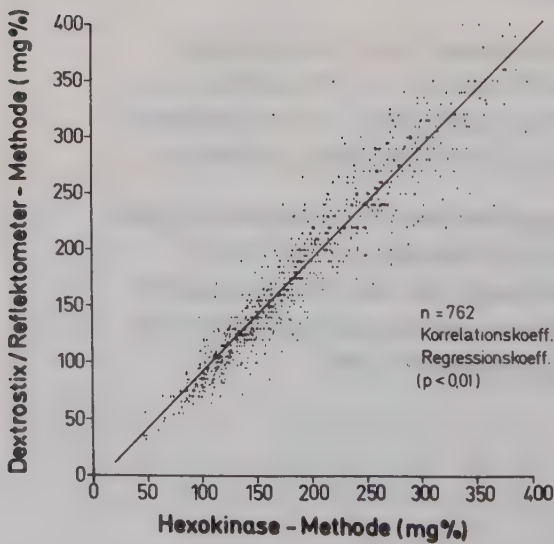


Abbildung 2

Tabelle 1

Gesamtkorrelations- und Regressionskoeffizienten bei
Anwendung des Reflektometers im Vergleich zu den
Referenzmethoden

	Anzahl der Blutproben n	Korrelations- koeffizient im Konfidenzintervall (p 0,01)	Regressions- koeffizient im Konfidenzintervall (p 0,01)
o-Toluidin- gegen TM- Eyetone Methode	916	$0,915 \leq 0,928 \leq 0,939$	$1,076 \leq 1,126 \leq 1,176$
Hexokinase- gegen TM- Eyetone Methode	762	$0,934 \leq 0,945 \leq 0,954$	$0,969 \leq 1,001 \leq 1,034$

Tabelle 2

Korrelations- und Regressionskoeffizienten beim Vergleich
der Referenzmethode Hexokinase, durchgeführt in zwei
verschiedenen Labors

	Anzahl der Blutproben n	Korrelations- koeffizient im Konfidenzintervall (p 0,01)	Regressions- koeffizient im Konfidenzintervall (p 0,01)
Hexokinase Labor I gegen Hexokinase Labor II	533	$0,945 \leq 0,955 \leq 0,964$	$0,913 \leq 0,926 \leq 0,939$

Tabelle 3

Mittelwerte und Korrelationskoeffizienten von Versuchs- und Referenzmethoden in verschiedenen Blutzuckerbereichen (mg/100 ml)

Bereiche der gebildeten Gruppen (mg/100 ml) o-Toluidin-Methode	Anzahl der Blutproben n	Reflektometer-Methode (Mittelwert)	o-Toluidin-Methode (Mittelwert)	Korrelationskoeffizient (r) im Konfidenzintervall (p 0,01)
0 - 100	126	82,8	85,3	$0,505 \leq 0,657 \leq 0,77$
80 - 140	358	112,6	112,1	$0,601 \leq 0,681 \leq 0,77$
140 - 160	116	158,3	149,3	$-0,032 \leq 0,237 \leq 0,40$
160 - 250	317	220,9	198,5	$0,617 \leq 0,699 \leq 0,77$
100 - 250	692	172,0	160,0	$0,861 \leq 0,885 \leq 0,93$
250 - 400	110	302,6	286,3	$0,217 \leq 0,437 \leq 0,63$
Bereiche der gebildeten Gruppen (mg/100 ml) Hexokinase-Methode	Anzahl der Blutproben n	Reflektometer-Methode (Mittelwert)	Hexokinase-Methode (Mittelwert)	Korrelationskoeffizient (r) im Konfidenzintervall (p 0,01)
0 - 100	57	73,7	85,5	$0,536 \leq 0,739 \leq 0,86$
80 - 140	212	102,7	115,0	$0,611 \leq 0,711 \leq 0,77$
140 - 160	90	135,8	149,1	$-0,121 \leq 0,396 \leq 0,44$
160 - 250	273	195,1	199,7	$0,642 \leq 0,725 \leq 0,79$
100 - 250	525	157,7	166,2	$0,868 \leq 0,893 \leq 0,93$
250 - 400	186	286,6	298,5	$0,552 \leq 0,670 \leq 0,70$

Tabelle 4

Vergleich von mit dem Faktor zwei multiplizierten
30 sec Blutglucosewerten der Reflektometer-Methode mit
Blutzuckerwerten der Hexokinase-Methode

Hexokinase-Methode mg/100 ml	Reflektometer-Methode 30 sec Werte mit zwei multipliziert mg/100 ml
406	320
432	364
376	370
345	380
347	420
415	430
428	430
426	440
464	416
445	440
464	440
434	450
447	490

D) Diskussion

1) Besprechung des vorliegenden Schrifttums

Das erste Ames-Reflektometer wurde in den ersten vorliegenden Arbeiten sehr günstig beurteilt. Jarrett und Mitarbeiter (6) errechneten bei 122 untersuchten Blutproben einen Korrelationskoeffizienten von 0,98 zur Referenzmethode (Ferricyanid-Methode, Autoanalyser). Sie fanden bei der reflektometrischen Messung geringere Blutzuckerkonzentrationen als bei Verwendung der Referenzmethode, was sich aus der Lage der Regressionsgeraden in der dargestellten Graphik nur abschätzen läßt. Obwohl dabei um 30 mg bis 40 mg/100 ml Blut geringere Blutzuckerkonzentrationen ermittelt wurden, gaben die Autoren eine sehr zufriedenstellende Beurteilung über diese reflektometrische Messung ab.

Das Gerät wurde von Mazzaferri und Mitarbeitern (13) bei 34 Glucosetoleranztests eingesetzt; sie fanden in 94 % identische Ergebnisse zwischen Versuchs- und Vergleichsmethode (Autoanalyser, Ferricyanid-Methode). Hier lag der Korrelationskoeffizient bei 0,84. Die Betrachtung der Graphik erweist, daß gegenüber der Referenzmethode höhere Blutzuckerwerte gefunden worden sein müssen. Der Autor gibt eine günstige Beurteilung der Reflektometer-Methode ab.

Auch Balazs (1) errechnet einen Korrelationskoeffizienten von 0,977 zur Referenzmethode (Autoanalyser, Ferricyanid-Methode) und äußert sich ebenfalls befriedigt über seine Ergebnisse;

allerdings bemängelt er die ungenügende Eichmöglichkeit in den drei Meßbereichen.

Schütz und Maute (17) gehen sogar so weit, daß sie die reflektometrische Messung mit exakten photometrischen Bestimmungen gleichsetzen, nachdem sie einen Korrelationskoeffizienten von 0,98 bis 0,99 und einen extrem niedrigen Variationskoeffizienten von durchschnittlich 3,5 % fanden und obwohl ein nicht unbeträchtlicher Teil der Einzelwerte über die 10 %-Grenze streute.

Auch Mehnert (14) bestätigte in einer orientierenden Voruntersuchung die geringe Fehlerbreite der Methode bei einem Vergleich mit der Hexokinase- und o-Toluidin-Methode.

Kattermann und Schlaeger (7) äußern sich über die reflektometrische Messung zurückhaltend. Sie fanden einen systematischen Fehler von ca. 30 mg bis 40 mg/100 ml Blut, um den das Gerät zu niedrige Werte anzeigte, was durch die Ein-Punkt-Eichung des Gerätes (bei 110 mg/100 ml) verursacht sein könnte.

Auch Kutter (12) bestätigte die von Kattermann und Schlaeger (7) gemachten Erfahrungen auf Grund der bis dahin vorliegenden Ergebnisse und eigener unveröffentlichter Arbeiten. Er machte erstmals aufmerksam auf den Einfluß, den der Hämatokritwert auf die Reflektometerergebnisse hat. So liegen bei steigendem Hämatokrit niedrigere Werte für die Blutzuckerkonzentration gemessen mit dem Reflektometer vor.

Schließlich verglich Simon (18) reflektometrische Messungen mit der o-Toluidin- und der Hexokinase-Methode an einem Patientengut von 1043 Diabetikern. Er fand dabei Korrelationskoeffizienten von 0,936 (o-Toluidin) und 0,975 (Hexokinase) und Steigungen der Regressionsgeraden von 1,05 bzw. 1,04. Dies ist ein Ausdruck für zu niedrige reflektometrisch gemessene Werte der Blutzuckerkonzentrationen gegenüber den Werten der Referenzmethoden. Auch er forderte die Schaffung besserer Eichmöglichkeiten.

Zusammenfassend betrachtete Haslbeck (5) das Dextrostix-Reflektometersystem auf Grund eigener Untersuchungen und der Beurteilung der Ergebnisse anderer Autoren bei der Blutzuckerkontrolle eines bekannten Diabetes mellitus für ausreichend genau, jedoch ist auch er, wie andere Autoren (7, 12, 18) der Meinung, daß diese Analysenmethode die herkömmlichen quantitativen Blutzuckerbestimmungen nicht ersetzen kann und zum Einsatz bei der präzisen Erfassung frühdiabetischer Zustände mit Hilfe von Provokationstests ungeeignet ist.

Aus diesem Grunde wurde ein neues Reflektometer (EyetoneTM-Reflektometer) entwickelt, das zwei Eichpunkte (50 mg/100 ml und 400 mg/100 ml) besitzt, nur eine Skala bis 400 mg/100 ml hat und an ein Stromnetz anzuschließen ist. Dieses Gerät wurde von Schersten und Mitarbeitern (16) getestet und andere Eichpunkte als günstiger empfunden. Sie erreichten mit den Eichpunkten 40 mg/100 ml und 280 mg/100 ml bzw.

40 mg/100 ml und 300 mg/100 ml Ergebnisse, die mit der Hexokinase-Methode als Referenzmethode relativ gut übereinstimmten. Dabei lagen die Korrelationskoeffizienten zwischen 0,99 und 0,97. Sie bezeichneten die Eichpunkte 40 mg/100 ml und 290 mg/100 ml als ideal, wobei sie einen Variationskoeffizienten von durchschnittlich nur 5,4 % fanden. Insgesamt wurde dieses Gerät von ihnen als sehr brauchbar empfunden zur Blutzuckerkontrolle für ambulante Patienten.

Pröls und Mitarbeiter (15) verglichen das vorliegende EytoneTM-Reflektometer und ein anderes Gerät, das auf reflektometrischer Messung beruht (Reflomat^R/Boehringer), mit der Hexokinase- und der o-Toluidin-Methode und ermittelten einen insgesamt recht brauchbaren Korrelationskoeffizienten von 0,9. Auch sie bezeichneten ihre Ergebnisse als zufriedenstellend, halten das Gerät jedoch für die präzise Diagnostik frühdiabetischer Stoffwechselstörungen für noch nicht einsatzfähig.

Wegen der schnellen und einfachen Handhabung und der für die Überwachung eines eingestellten Diabetikers hinreichenden Genauigkeit bezeichnet Fenner (2) dieses Blutzucker-Meßprinzip als Fortschritt für die tägliche Analytik in der Praxis des Arztes. Seinen Erfahrungen nach ist die Abweichung im Meßbereich um 50 mg/100 ml gegenüber anderen Methoden höher als in den oberen Bereichen.

Auf Grund seiner Untersuchung hält Klima (8) das vorliegende Gerät für die Erkennung einer diabetischen Stoffwechselstörung und für laufende Blutzuckerkontrollen bei Diabetikern für ausreichend genau, wobei er bei ca. 83 Untersuchungen einen äußerst niedrigen Variationskoeffizienten von 3,6 % errechnen konnte. Weitere statistische Angaben wurden von ihm nicht gemacht.

Ziegler (20) schlägt vor, bei Blutzuckerwerten über 350 mg bis 400 mg/100 ml die Blutprobe mit 4 %igem Rinderalbumin in Ringerlösung zu verdünnen, um zu aussagekräftigen Werten zu kommen. Außerdem hält er den Einbau eines Kurzzeitweckers in das Gerät für wünschenswert, um falsch niedrige Blutzuckerwerte wegen zu frühen Ablesens zu vermeiden. Insgesamt betont er die überraschend große Verlässlichkeit von Teststreifen-Photometern und ihre Eignung für das kleine Praxislabor und für die Selbstkontrolle intelligenter und geschulter Diabetiker.

2) Diskussion der eigenen Ergebnisse

Wie schon anfangs darauf hingewiesen wurde, sind die Messungen am neuen EyetoneTM-Reflektometer nur von einer Person vorgenommen worden, um Fehler durch ungenügende Einarbeitung zu vermeiden. Daher wurden auch ca. 100 Blutproben einer Voruntersuchungsreihe nicht zur endgültigen Bewertung herangezogen. Eine solche Einarbeitung ist, wie schon von Simon (18) betont, unbedingt notwendig, da trotz der

Einfachheit der Meßtechnik Möglichkeiten zu Fehlbestimmungen reichlich vorhanden sind. Diese Fehlerquellen werden erst mit zunehmender Routine vermindert. Als individuelle Fehlerquellen bleiben das Beschicken des Streifens, die genaue Messung der Reaktionszeit und das Abwaschen und Abtrocknen des Streifens. Außerdem muß erwähnt werden, daß das Ablesen der Blutzuckerkonzentrationen im Bereich über 200 mg/100 ml durch die von da ab logarithmische Skaleneinteilung erschwert wird.

Um als Fehlermöglichkeit den Einfluß des von der Norm abweichenden Hämatokrit auf die reflektometrische Messung, auf die schon Kutter (12) aufmerksam machte, auszuschließen, wurden nur Blutproben von Patienten, die nicht zusätzlich an Störungen des blutbildenden Systems und des Wasser- und Elektrolythaushaltes litten, verwandt.

Ferner sollte die Fehlerquelle auf Grund verschieden breiter Teststreifen nicht unerwähnt bleiben, wobei immer wieder zu schmale und zu breite Streifen gefunden wurden. Die zu schmalen Streifen zeigten bei der Messung deutliche Abweichungen gegenüber den normal breiten Streifen. Die zu breiten Streifen ließen sich nicht in die Schaltklappe mit dem Meßeinsatz einführen. Auch muß beachtet werden, daß das Gerät eine halbe Stunde vor Benützung an ein Stromnetz angeschlossen und angeschaltet wird, da sich in der Zeitspanne von einer halben Stunde die Eichpunkte immer wieder verschoben und somit eine aussagekräftige Messung von

Blutzuckerkonzentrationen unmöglich war. Diese Tatsache ist besonders wichtig bei Mitnahme des Gerätes auf Hausbesuche und in Notfallsituationen, wenn das Gerät erst eingeschaltet werden muß.

Bei der Betrachtung der reflektometrisch gemessenen Ergebnisse im Vergleich mit den Referenzmethoden läßt sich ein durchaus zufriedenstellendes Gesamturteil abgeben. Der Vergleich der reflektometrisch bestimmten Blutzuckerwerte mit den Referenzmessungen (o-Toluidin- und Hexokinase-Methode) wies einen Gesamtkorrelationskoeffizienten r von 0,928 und 0,945 auf. Dabei war feststellbar, daß die mit dem EytoneTM-Reflektometer bestimmten Blutglucosekonzentrationen gegenüber den mit o-Toluidin ermittelten Werten etwas zu hoch lagen. Dies drückte sich in einem Regressionskoeffizienten von 1,13 aus. Gegenüber den mit Hexokinase gewonnenen Werten lagen sie jedoch etwas zu tief. Der Regressionskoeffizient in diesem Fall lag bei 1,001.

Insgesamt ergibt die Korrelationsrechnung mit der Hexokinase-Methode als Referenzmethode den besten Wert. Im Vergleich mit der Hexokinase-Referenzmethode waren die reflektometrisch bestimmten Blutglucosekonzentrationen im Bereich unter 100 mg/100 ml um ca. 10 mg/100 ml niedriger, was bei der Beurteilung von Hypoglykämien beachtet werden sollte. Da nur Blutzuckerwerte bis 400 mg/100 ml angezeigt werden, wurde bei praecomatösen und comatösen Patienten versucht, durch Verkürzung der Reaktionszeit

auf 30 Sekunden einen in etwa aussagekräftigen Wert zu bekommen. Jedoch ließen sich die Werte über 400 mg/100 ml nur überschlagsmäßig abschätzen.

In dem für die Erstdiagnostik eines Diabetes mellitus wichtigen Bereich zwischen 140 mg und 160 mg/100 ml lagen die mit dem EytoneTM-Gerät gemessenen Werte verglichen mit der Referenzmethode (Hexokinase) zwischen 90 mg und 195 mg/100 ml, so daß eine eindeutige diagnostische Aussage nicht möglich ist. Diese ungenügende Trennschärfe schränkt die Brauchbarkeit des EytoneTM-Gerätes zur Erst-erfassung des Diabetes mellitus sehr stark ein. Aus dem gleichen Grunde muß seine Anwendung bei den oralen Glucose-Toleranz-Testen zur Feststellung eines subklinischen Diabetes mellitus sehr kritisch gesehen werden.

In 533 Blutproben wurden Hexokinasebestimmungen parallel in zwei verschiedenen Labors durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Dabei wurde ein Korrelationskoeffizient $r = 0,955$ errechnet, der somit nur etwas höher als der zwischen der Referenzmethode (Hexokinase) und der Reflektometermethode liegt. Insbesondere fand sich auch hier in dem Bereich von 140 mg und 160 mg/100 ml eine Streuung der Einzelwerte zwischen 110 mg und 176 mg/100 ml.

Anläßlich dieser vergleichenden Methodenkritik muß erneut darauf hingewiesen werden, wie wichtig es ist, die Diagnose eines Diabetes mellitus nicht auf einen einzigen Blutzuckerwert zu

begründen und auch bei den Glucose-Toleranz-Testen möglichst viele Blutglucosebestimmungen durchzuführen.

3) Praktische Wertung

Vorteilhaft an dem neuen EyetoneTM-Reflektometer ist die für eine eingeübte Person einfache Handhabung, die gute Transportfähigkeit des leichten und handlichen Gerätes und der rasche Erhalt von relativ genauen Blutzuckerwerten im Gegensatz zu den erheblich aufwendigeren enzymatischen Bestimmungen.

Als Nachteil muß die Anlaufzeit des Gerätes von einer halben Stunde gesehen werden.

Das Gerät erscheint geeignet zur engmaschigeren Überwachung eines bekannten Diabetes mellitus in Klinik und Praxis. Jedoch bei massiven diabetischen Stoffwechselentgleisungen mit Werten über 400 mg/100 ml, bei der Ersterfassung des Diabetes mellitus und der Beurteilung der Glucose-Toleranz-Teste sollte den enzymatischen Bestimmungen der Vorzug gegeben werden. Bei der Diagnose von Hypoglykämien ist zu beachten, daß die reflektometrisch gemessenen Blutzuckerkonzentrationen ca. 10 mg/100 ml niedriger liegen als die enzymatisch ermittelten Werte.

Ob eine Eichung des Gerätes mit anderen Eichpunkten bei 40 mg/100 ml und 290 mg/100 ml (16) gegenüber 50 mg/100 ml und 400 mg/100 ml genauere Ergebnisse bringt, sei dahingestellt.

E) Zusammenfassung

Die bisherigen Methoden zur Schnellbestimmung der Blutglucose mittels Teststreifen auf enzymatischer Grundlage hatten den Nachteil der subjektiven Auswertung. Außerdem konnten höhere Blutzuckerkonzentrationen (über 250 mg/100 ml) damit nicht beurteilt werden. Auch das erste zur Auswertung der Teststreifen entwickelte Reflektometer (Ames^R) wurde übereinstimmend als für den praktischen Gebrauch nicht ausreichend zuverlässig beurteilt (7, 12, 18). Ziel dieser Arbeit war es, eine verbesserte Ausführung des Reflektometers (EyetoneTM) auf seine Eignung zu untersuchen.

Neu bei diesem Gerät war vor allem die Zwei-Punkt-Eichung bei 50 mg/100 ml und 400 mg/100 ml Blut, der ausschließliche Netzbetrieb mit einer Anlaufzeit des Gerätes von einer halben Stunde sowie die Messung auf nur einer Skala bis 400 mg/100 ml Blut. Bei der klinischen Testung wurden die dabei erhaltenen Ergebnisse in Relation zu den herkömmlichen Bestimmungen (o-Toluidin-Methode und Hexokinase-Methode) gesetzt.

Insgesamt wurden 969 Blutzuckerbestimmungen durchgeführt. Bei diesen wurden größtenteils mehrere Vergleichsmethoden parallel angewandt. Es wurden 916 Messungen mit der o-Toluidin-Methode und 762 mit der Hexokinase-Methode ver-

- 10) Kutter, D., M. Leitz:
Die Bestimmung hoher Blutzuckerwerte
mit Dextrostix
Therapie der Gegenwart 105, 495 (1966)
- 11) Kutter, D.:
Schnelltests
3. Aufl., München/Berlin/Wien 1969
- 12) Kutter, D.:
Schnell- und Fertigtests bei der
Rationalisierung im Routinelaboratorium
Diagnostik 5, 1972, 264 - 268
- 13) Mazzaferri, E.L., T.G. Skillmann,
R.R. Lanese, M.P. Keller:
Use of test strips with colour meter to
measure blood glucose
Lancet 331, 1970
- 14) Mehnert, H.:
Biochemie und Klinik des Insulinmangels
in O. Wieland und H. Mehnert
G. Thieme Verlag, 1971, 90
- 15) Pröls, H., E. Standl, M. Haslbeck, H. Mehnert:
Die Bestimmung der Blutglucose mit ver-
schiedenen neueren Reflektometersystemen
(EyetoneTM, Ames und Reflomat^R, Boehringer)
9. Kongreß d. Dt. Diabetesgesellschaft
in Travemünde, 1974
- 16) Schersten, B., C. Kuhl, A. Hollender,
R. Ekman:
Blood Glucose Measurement with Dextrostix
and New Reflectance Meter
Brit. Med. J. 3, 1974
- 17) Schütz, W., J. Maute:
Exakte Bestimmung des Blutzuckers mit
Dextrostix und reflektometrische Messung
Dt. Med. J. 22, 1971, 784
- 18) Simon, B., M. Haslbeck, H. Mehnert:
Schnellbestimmungen der Blutglucose durch
reflektometrische Auswertung von Teststreifen
Verh. d. Ges. f. Inn. Med. 78, 1253, 1972

- 19) Weiss, L., M. Haslbeck:
Überwachung des Diabetes
Diagnostik 4, 398 - 401, 1971
- 20) Ziegler, H.:
Mit dem Teststreifen-Photometer
kontrolliert der Diabetiker sich selbst
Medical Tribune 48, 1975, 22

Herrn Professor Dr. H. Mehnert danke ich für die Überlassung des Themas und die wohlwollende Unterstützung und Korrektur der Arbeit.

Herrn Privat-Dozent Dr. M. Haslbeck und Herrn Dr. E. Standl danke ich für wertvolle Ratschläge und Hilfen bei der Abfassung der Arbeit.

Sehr zu Dank verpflichtet bin ich auch den medizinisch-technischen Assistentinnen der III. Medizinischen Abteilung des Krankenhauses München-Schwabing, Fräulein Vorderbrügge, Fräulein Altmann, Frau Dombrock, Frau Bauer, Frau Krehut, Frau Bauer und Fräulein Richter, die mir stets sehr hilfreich zur Seite standen.

Lebenslauf

Eltern: Dr.med. Dr.med.dent. Maximilian Fach,
Arzt und Zahnarzt in München
Dr.med.dent. Käthe Fach, geb. Kindt,
Zahnärztin in München

15. November 1943 in Kaufbeuren/Bayern geboren

1949 Eintritt in die Volksschule

1964 Reifeprüfung am Humanistischen Gymnasium
der Schule "Birklehof",
Hinterzarten im Schwarzwald

1964/65 Ableistung der Wehrpflicht

1965 Immatrikulation an der
Ludwig-Maximilian-Universität, München

1967 Naturwissenschaftliche Ärztliche
Vorprüfung in München

1970 Ärztliche Vorprüfung in München

1973 Staatsexamen in München bestanden

1974 Approbation als Arzt

Verheiratet seit 1968

Geburt unserer Tochter Katja 1968

Geburt unseres Sohnes Kilian 1972

